

補助事業番号 2020M-161

補助事業名 2020年度 高温によるアミロイド凝集反応の促進機器の開発 補助事業

補助事業者名 大阪大学国際医工情報センター 山口圭一

1 研究の概要

現在、世界中でアミロイド病の治療薬の開発が行われているが、早期診断法と組み合わせることが重要である。本補助事業では、アミロイド病の早期診断を目指して、“高温によるアミロイド凝集反応の促進機器”を研究開発する。まず、分光蛍光光度計を用いて、種々のアミロイド原性蛋白質の高温加熱による凝集実験を行った。次に、PCR thermal cyclerとプレートリーダーを組み合わせ、高温加熱による多サンプルのアミロイド凝集実験を行った。その結果、高温加熱により、パーキンソン病の原因蛋白質である α シヌクレインのアミロイド線維形成が促進された。また、試験管内で作製したアミロイド線維を5%加えることで、シーディングによるアミロイド凝集の促進が観察された。生体試料によるアミロイド凝集のシーディングについては検討中であり、今後も条件検討が必要である。生体中の極微量な凝集核を検出することが可能になれば、アミロイド病の早期診断につながると期待される。

2 研究の目的と背景

日本はこれから超高齢化社会を迎えるにあたり、家族性アミロイドポリニューロパチーや透析アミロイドーシスなどの全身性アミロイドーシスやパーキンソン病などの神経変性疾患の治療法の開発が急がれている。現在、世界中でアミロイド病の治療薬の開発が行われているが、早期診断法と組み合わせることが重要である。申請者は、これまで高温によるアミロイド線維の凝集機構を明らかにしてきた。本補助事業では、多検体のアッセイが可能な“高温によるアミロイド凝集反応の促進機器”を開発することを目的とする。

アミロイド病では、その原因蛋白質がアミロイド線維と呼ばれる β シート構造に富む凝集体を形成して、全身の臓器に蓄積することによって引き起こされる。蓄積したアミロイド線維は、血液または脳脊髄液にも極少量流出している。これまで、攪拌や超音波による凝集核の増幅による診断法が開発されてきた。高温にすることで分子間の疎水的相互作用が強くなり、蛋白質は凝集しやすくなる。“高温によるアミロイド凝集反応の促進機器”により、生体中の極微量の凝集核を検出することが可能になれば、アミロイド病の早期診断につながると期待される。

3 研究内容

高温によるアミロイド凝集反応の促進機器の研究開発

(<https://supersaturation.sakura.ne.jp>),

(<https://supersaturation.sakura.ne.jp/research.html>)

分光蛍光光度計を用いて、高温加熱することで、透析アミロイドーシスの原因蛋白質である β 2ミクログロブリン(β 2m)、パーキンソン病の原因蛋白質である α シヌクレイン(α -syn)のアミロイド線

維形成が促進された(図1)。高温にすることで蛋白質は変性し、さらに分子間の疎水的相互作用が強くなることで、凝集体形成が促進されると考えられる。

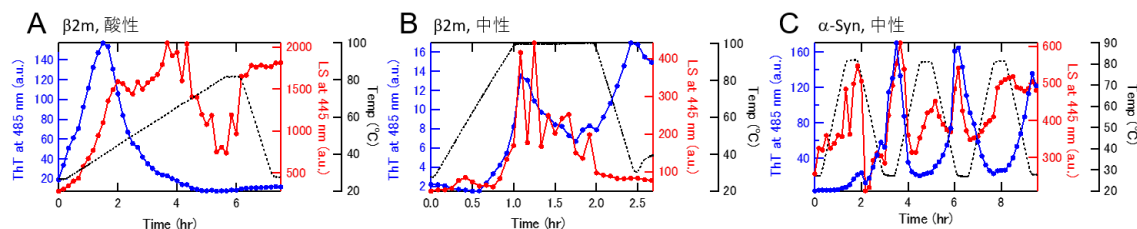


図1. 昇温による β 2mと α -synのアミロイド形成反応。(A)酸性、(B)中性における β 2mと(C)中性における α -synのアミロイド凝集反応. ThT蛍光、LSと温度はそれぞれ青、赤と黒(点線)で示す。

次に、PCR thermal cyclerとプレートリーダーを組み合わせることで、高温加熱による多サンプルのアッセイが可能なアミロイド凝集実験を実施した。PCR用96ウェルプレートに反応溶液を100 μ L加えて、PCR thermal cyclerで高温加熱する(図2)。アミロイド線維形成は、アミロイドに特異的に結合して蛍光を発するチオフラビンT (ThT) の蛍光をプレートリーダーで測定して追跡した。

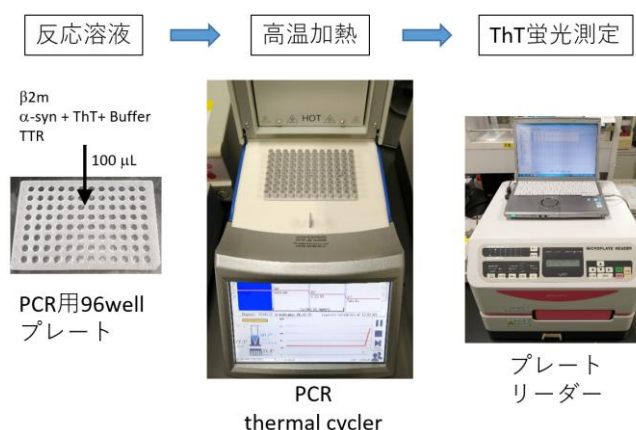


図2. PCR thermal cyclerを用いた高温加熱によるアミロイド凝集実験の概要。

一般に、試験管内では α -synのアミロイド線維形成には1週間程度を要する。PCR thermal cyclerを用いて、1 min@80°C+2 min@60°Cのサイクルを繰り返すことで(図3A)、10時間程度でパーキンソン病の原因蛋白質である α -synのアミロイド線維が形成された。さらに、ジルコニアビーズを用いることで、アミロイド凝集が3-4時間に短縮された(図3B)。また、反応のバラツキの程度を示す変動係数(CV値)は、(-)ビーズでは37.5%、(+)ビーズでは8.7%であり、反応のバラツキは比較的小さいと考えられる。本補助事業の研究成果は、第41回超音波シンポジウムUSE2020でポスター発表(オンライン開催)した(図4)。

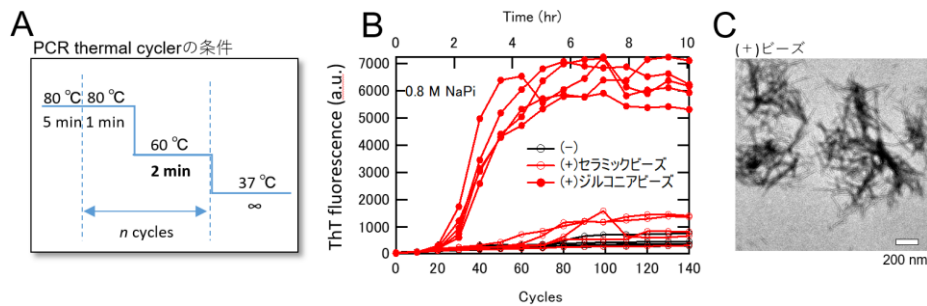


図 3. PCR thermal cyclerを用いた α -synのアミロイド凝集実験.(A) PCR thermal cyclerによるアミロイド形成条件の例.(B)中性、0.8 M NaPi中におけるアミロイド形成反応. ビーズなし(黒)、セラミックビーズあり(白抜き赤)、ジルコニアビーズあり(赤).(C) α -synのアミロイド線維の電子顕微鏡画像.

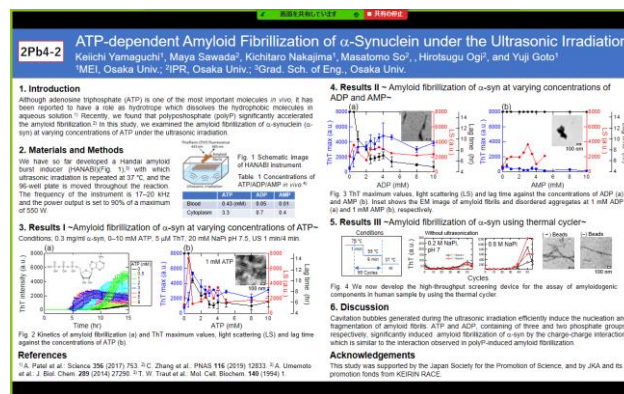


図 4. 第41回超音波シンポジウムUSE2020のポスター発表(オンライン)のPCスクリーン画像.

4 本研究が実社会にどう活かされるか—展望

PCR thermal cyclerを用いることで、一度に多数のアミロイド凝集反応のアッセイが可能である。現在、25種類以上のアミロイド病が知られている。種々のアミロイド原性蛋白質について、アミロイド凝集の実験系ができる。アミロイド病の一つであるパーキンソン病の患者数は約16万人にのぼる。今後、高温によるアミロイド凝集反応の最適化により、生体内の極微量の凝集核を検出することが可能になれば、アミロイド病の早期診断につながると期待される。

5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

世界中でアミロイド病の治療薬の開発が行われているが、早期診断法と組み合わせることが重要である。アミロイド病の早期診断は、超音波を用いたProtein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA)法やHANDai Amyloid Burst Inducer (HANABI)、攪拌を用いたReal-Time Quaking-Induced Conversion (RT-QuIC)法などが知られているが、早期診断は非常に難しいのが現状である。本補助事業で開発した高温によるアミロイド凝集反応の促進機器は、高温にすることで蛋白質凝集が促進される基本的な原理に基づいている。PCR thermal cyclerを用いることで、自由な温度設定と多サンプルのアッセイが可能である。応用範囲は広く、早期診断法の開発だけでなく、アミロイド

研究にも役立つと考えられる。

6 本研究にかかわる知財・発表論文等

【学会発表】

山口 圭一, 澤田 眞弥, 中島 吉太郎, 宗 正智, 荻 博次, 後藤 祐児. 超音波照射下におけるATP依存的 α シヌクレインのアミロイド線維形成. 第41回超音波シンポジウムUSE2020. 2020年11月26日. ポスター発表 (オンライン開催) .

7 補助事業に係る成果物

(1)補助事業により作成したもの

該当なし。

(2)(1)以外で当事業において作成したもの

該当なし。

8 事業内容についての問い合わせ先

所属機関名: 大阪大学 国際医工情報センター

(オオサカダイガク コクサイイコウジョウホウセンター)

住 所: 〒565-0871

大阪府吹田市山田丘2-2

担 当 者: 助教 (ジョキョウ)

担 当 部 署: 蛋白質凝集制御デバイス寄附研究部門

(タンパクシツギョウシュウセイギョデバイスキフケンキュウブモン)

E - m a i l: kyamaguchi@mei.osaka-u.ac.jp

U R L: <https://supersaturation.sakura.ne.jp>